Isolierung eines Proteinasen-Inhibitors aus Schweinesamen

Hartmut-Eckehard Frühbrodt

1971

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
der Universität München

(Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Werle)

ISOLIERUNG EINES PROTEINASEN-INHIBITORS AUS SCHWEINESAMEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten
Medizin verfaßt und einer Hohen Medizinischen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von

Hartmut-Eckehard Frühbrodt

aus

Namslau/Schlesien

München 1971

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. H. Fritz,
Prof. Dr. Dr. E. Werle

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 22. 6. 1971

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Druck: UNI-Druck, 8 München 13, Amalienstraße 85

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Eigenschaften der Inhibitoren erläutert am Beispiel des spezifischen Trypsininhibitors	2
Spezifische Trypsininhibitoren und ihre physiologischen Aufgabenbereiche	6
Arbeitsgang bei der Isolierung des Inhibitors aus dem Sperma vom Schwein	9
Chemische Eigenschaften des Inhibitors aus Schweinesperma	11
Diskussion und Zusammenfassung	16
Literaturverzeichnis	20

Einleitung

Im Organismus laufen alle Stoffwechselvorgänge unter der Katalyse von Enzymen ab. Um ihr genaues und sinnvolles Ineinandergreifen zu gewährleisten, müssen mehrere Regelmechanismen bestehen. Gedacht sei dabei an Milieufaktoren, wie pH-Wert, Ionen- und Substratkonzentrationen, an das Gleichgewicht zwischen Biosynthese (1) und Abbau und an die Kontrolle durch die Enzym-Inhibitoren.

Ihrem chemischen Wesen nach handelt es sich bei den Inhibitoren um Polypeptide, Proteine und Glykoproteine, die mit den entsprechenden Enzymen unter Komplexbildung reagieren; meist bildet sich ein stöchiometrischer Komplex zwischen einem Inhibitorenmolekül und einem Enzymmolekül, so daß die enzymatische Aktivität blockiert wird.

Proteinaseninhibitoren haben ihren Wirkungsbereich in vielen Zellarten und Flüssigkeiten des tierischen und pflanzlichen Organismus (2). So wurden bisher z.B. Inhibitoren aus der Sojabohne (3), aus Ovomucoid, aus dem Serum und aus Tierorganen (Pancreas, Lunge, Samenblasen u.a.) isoliert. Sie haben ein mehr oder weniger breites Hemmspektrum, d.h. sie vermögen verschiedene Enzyme wie:Trypsin, Chymotrypsin, Kallikreine, Thrombin, Plasmin u.a. zu hemmen.

Es gibt höhermolekulare (MG 20.000 - 800.000) und niedermolekulare Inhibitoren (unter 20.000); letztere sind meist hitze- und säurebeständig.

Ihre weiteren Eigenschaften seien anhand der Proteinaseninhibitoren bzw. des spezifischen Trypsin-Inhibitors aus den Bauchspeicheldrüsen von Rind, Mensch, Schwein, Hund und Katze erläutert.

Eigenschaften der Inhibitoren erläutert am Beispiel des spezifischen Trypsininhibitors

KUNITZ und NORTROP (4) isolierten 1936 aus Rinderpancreas einen Trypsininhibitor in kristalliner Form; ein Polypeptid, welches 1930 bereits von FREY, KRAUT und WERLE (5) in Parotis, Milz und Lymphknoten des Rindes entdeckt wurde und heute noch unter dem Handelsnamen "Trasylol" therapeutisch verwendet wird.

Dieser Inhibitor zeichnet sich durch sein ungewöhnlich breites Hemmspektrum aus, da er außer Trypsin und Chymotrypsin auch Plasmin und Kallikreine verschiedenster Herkunft zu hemmen vermag.

Weder Enzyme noch Pepsine oder Carboxypeptidasen vermögen ihn - ohne vorherige Denaturierung - abzubauen.

Neben diesem polyvalenten Inhibitor isolierte KAZAL 1948 noch einen spezifischen Trypsininhibitor aus Rinderpancreasextrakten (6).

Untersuchungen an nativen und enteiweißten Extrakten aus den Bauchspeicheldrüsen von Hund, Katze, Schwein und Mensch (7) bestätigten das Vorhandensein des "Kazalinhibitors".

Interessanterweise stieß man bei Pancreassekretionsstudien bei Mensch, Schwein und Hund nur auf den spezifischen Trypsininhibitor. Daraus ist zu folgern, daß der spezifische Trypsininhibitor ein wesentlicher Bestandteil als Sekretprotein in den Bauchspeicheldrüsen vieler Wirbeltiere ist.

Seine chemische Untersuchung ergab folgende Eigenschaften: (8)

1., Reinheitsgrad:

Die spezifische Aktivität der über Trypsinharz isolierten und zweimal über Sephadex G25 entsalzten Inhibitorpräparate lag bei 3, 0 bis 3, 5 ImU/ng Einwaage, d.h., daß 1ng Inhibitor 3 - 3, 5ng Trypsin zu hemmen vermag. Der Wassergehalt betrug 7, 5 %, 15 % der Stickstoffanteil und der Salzgehalt betrug 5 %.

2., Molekulargewicht: 6.000 - 7.000.

3., Stabilität:

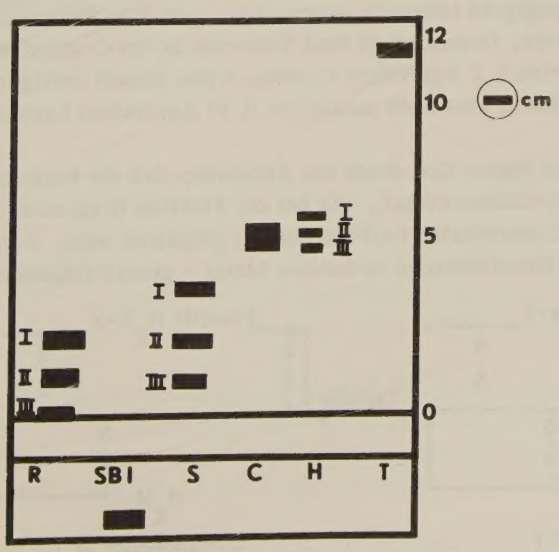
Nach dem Lyophilisieren erhaltenes weißes Pulver ist ebenso in neutralen wie in sauren Salzlösungen (pH 7 - 2) bei 0° - 20°C monatelang ohne Aktivitätsverlust haltbar. Der Inhibitor ist über kürzere Zeit säurestabil und hitzestabil bis 100°C (pH 7 - 3).

4., Elektrophorese:

Auf Celluloseacetatfolien als Trägersubstanz erfolgte eine Trennung in drei Fraktionen. Das Inhibitorpräparat aus menschlichem Pancreas zeigte nur zwei aktive Fraktionen, deren Wanderungsgeschwindigkeiten in etwa den Zonen 2 und 3 des Rinderpancreasinhibitors entsprachen.

Elektrophoretisches Verhalten der Inhibitoren aus Pancreas von Hund (H), Schwein (S) und Rind (R). Zum Vergleich: Sojabohneninhib. (SbI), a-Chymotrypsininhib. (C), Trypsin-Kallekrein-Inhib. (T) aus Rinderorganen.

Versuchsbedingungen: 0, 01 mBoratpuffer (pH 7, 0), Celluloseacetatfolien für präp. Elektrophorese (200V), Zeit: 2, 5 Stunden. Laufstrecke-Ordinate (cm).



Die einzelnen Inhibitoren unterscheiden sich durch die verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeiten ihrer Zonen. Am schnellsten wandern die Fraktionen des Inhibitors aus Hundepancreas, dessen IP bei 8, 0 liegt (IP von a-Chymotrypsininhib. = 8, 1). Der IP der Schweinepancreasfraktionen liegt nahe dem Neutralpunkt; damit besteht nur ein geringer Unterschied zu den Inhibitor-Fraktionen des menschlichen Pancreassekretes.

5., Aminosäurezusammensetzung:

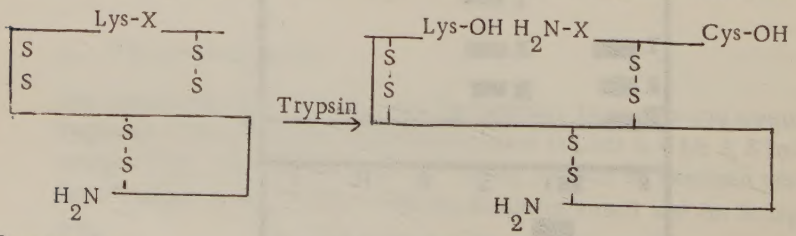
Untereinander unterscheiden sich z.B. die Fraktionen des Schweinepancreas-Inhibitors nur sehr gering eventuell im Amidierungsgrad voneinander. Auffallend ist das Fehlen der Aminosäuren: Histidin, Tryptophan und Phenylalanin.

Eine weitere gemeinsame Eigenschaft der Trypsininhibitoren ist das Vorhandensein von 3 Disulfidbrücken pro Molekül. Dies ist für ein Polypeptid (MG 6.000) relativ viel und spricht für eine kompakte Tertiärstruktur.

6., Zum Hemmzentrum:

Alle bisher isolierten Inhibitoren stellen ein Gemisch aktiver Fraktionen dar. Fritz, Hochstrasser und Tscheche konnten nachweisen, daß z.B. bei dem, durch Säulenchromatographie gewonnenen Inhibitor aus Schweinepancreas die drei aktiven Fraktionen nicht nur in der Aminosäurezusammensetzung, sondern auch im Amidierungsgrad identisch waren, d.h., was ihre Bausteine betraf, völlig identisch waren. Unterschiede fand Tscheche in der C-terminalen Aminosäure. Bei der Fraktion I: 1 Äquivalent Cystein, Lysin jedoch weniger als 0, 04 Äquivalent. Franktion II wies noch zusätzlich 0, 77 Äquivalent Lysin auf . (11)

Dieser Befund erklärt sich durch die Annahme, daß die Fraktion I noch eine intakte Polypeptidkette enthält, die bei der Fraktion II an einer Lys-X-Bindung (evtl. dem C-terminalen Halbcysteinrest) gespalten wird, jedoch noch über mindestens eine Disulfidbrücke verbunden bleibt - gemäß folgendem Schema:



Komponente I

Komponente II

Da auch die Fraktion III mit den beiden anderen in Aminosäurenzusammensetzung gleich ist, dürfte sie aus II durch Spaltung einer weiteren Lys-X- oder Arg-X-Bindung hervorgehen. (10)

Modifizierungen durch Einwirkung von Trypsin erhärten diesen Befund, daß alle drei Fraktionen ineinander umwandelbare Komponenten sind.

Die Hemmwirkung kann auf folgende zwei Weisen erklärt werden:

1., bei der Komplexbildung verbindet sich das aktive Zentrum des Trypsin mit dem "Hemmzentrum" des Inhibitors, einer Lys-X- oder Arg-X-Bindung.

2., Überwiegend sterische Faktoren könnten im Sinne einer räumlichen Abschirmung des aktiven Zentrums des Trypsins durch das Hemmzentrum des Inhibitors gegenüber dem Zutritt von Substratmolekülen für die Hemmwirkung verantwortlich sein.

Spezifische Trypsininhibitoren und ihre physiologischen Aufgabenbereiche

Nach den chemischen Eigenschaften der spezifischen Trypsininhibitoren bleiben nun noch die physiologischen Aufgabenbereiche zu behandeln. Drei Befunde verdienen besonderer Beachtung:

1., Die Abhängigkeit und Parallelität der Konzentrationen der Sekretproteine Trypsinogen und Inhibitor in Gewebe und Sekret. (12)

2., Die Tatsache, daß nur ein Inhibitor für Trypsin in einer - hinsichtlich der Enzymausstattung noch sinnvollen Konzentration - im Pancreasgewebe von Mensch, Hund, Katze und Rind vorkommt, sieht man von dem Sonderfall des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors ab. (13)

3., Die gemeinsame Eigenschaft der spezifischen Trypsininhibitoren, die sogenannte "Temporäre Hemmung".

Das Gleichgewicht - inaktives Trypsinogen - aktives Trypsin und Aktivierung der gespeicherten Proenzyme - ist gegen Entgleisung durch den Inhibitor gesichert. Er verhindert, daß aus irgendwelchen Gründen aktiv gewordenes Trypsin sein für die Verdauung bestimmtes Wirkungspotential bereits in den Acini oder im Gangsystem des Pancreas freisetzt.

Der Inhibitor übt also eine Schutzfunktion für das Gewebe aus. Im menschlichen Pancreassekret können 10 % (14) des insgesamt freisetzbaren Trypsin gehemmt werden, beim Hund weniger, nur 0, 5 - 2 %. (Übereinstimmung mit Greene und Mitarbeitern.)

Die Trypsininhibitoren vermögen, solange sie im Überschuß gegenüber dem freigesetzten Trypsin vorhanden sind, dessen Aktivität sofort und über längere Zeit völlig zu hemmen. Wird aber bei pathologischen Prozessen im Pancreasbereich mehr Trypsin freigesetzt, z.B. durch Bakterienrasen, als die vorhandene Menge an Inhibitor zu inaktivieren vermag, so wird der Inhibitor vom überschüssigen Trypsin selbst zerstört.

Nach Eintritt ins Duodenum wird das Trypsinogen durch die Enteropeptidase und autokatalytisch durch Trypsin rasch aktiviert. Der Inhibitor wird vom Trypsin sofort abgefangen und weiter durch Proteasen abgebaut, so daß seine Aminosäuren dem Organismus weiter zur Verfügung stehen.

Nicht nur die spezifischen Trypsininhibitoren weisen die Hemmung auf Zeit auf, auch die von HAENDLE und Mitarbeitern (15) gefundenen polyvalenten Inhibitoren aus Submandibularisdrüsen, Sperma und Samenblasen zeigen sie. Die Hemmung scheint also ein allgemeines, im Organismus vorkommendes Inhibierungsprinzip zu sein, während die Resistenz des Trypsin-Kallekrein-Inhibitors gegenüber einem proteolytischen Abbau den Ausnahmefall darstellt.

Die Bedeutung der in sehr hoher Konzentration in den Submandibularisdrüsen von Hund, Katze und Fuchs vorkommenden Inhibitoren dürften als Schutzfunktion gegenüber Proteasen bakterieller Herkunft dienen, die beim Aasfressen aufgenommen werden; sie sind nur lokal in Mundhöhle und Ösophagus wirksam, da sie durch Pepsin abgebaut werden. (16)

Auf die Funktion der Inhibitoren der accessorischen Geschlechtsdrüsen soll in der Schlußdiskussion eingegangen werden.

Arbeitsgang bei der Isolierung des Inhibitors aus dem Sperma vom Schwein

1., Enteiweißen in 6 %iger Perchlorsäure, mehrmaliges Abzentrifugieren und Auswaschen des Rückstandes mit 3 %iger Perchlorsäure.

2., Neutralisieren mit Kaliumcarbonat und Abfiltrieren des ausgefallenen Kaliumperchlorates mittels Faltenfilter. PH-Wert auf 5 zurückgestellt.

3., Reinigung und Isolierung über Trypsinharz
Prinzip:

a, Selektive Adsorption des Schweinesameninhibitors an das Enzymharz ; Bindung erfolgt in Form des Enzym-Inhibitor-Komplexes

b, Auswaschen der Fremdsubstanzen

c, Dissoziation des Enzym-Inhibitor-Komplexes und Elution des Inhibitors

d, Neutralisieren und Konzentrieren des Eluates

e, Entsalzen des Inhibitors durch Gelfiltration über G 25

4., Chromotographische Auftrennung über SE-Sephadex:
Versuchsbedingungen:

1, Säulenmaße: 1, 9 cm • 6, 3 cm

2, Tropfgeschwindigkeit: 13 gtt./min

3, PH-Wert: 5, 5 äquilibriert mit 0, 05 Ammoniumacetatlösung

4, Gradient: 0, 05 NH_4Ac —— 0, 4 NaCl + 0, 05 NH_4Ac

5, Aufgetragene Menge: ca 143.000 ImU

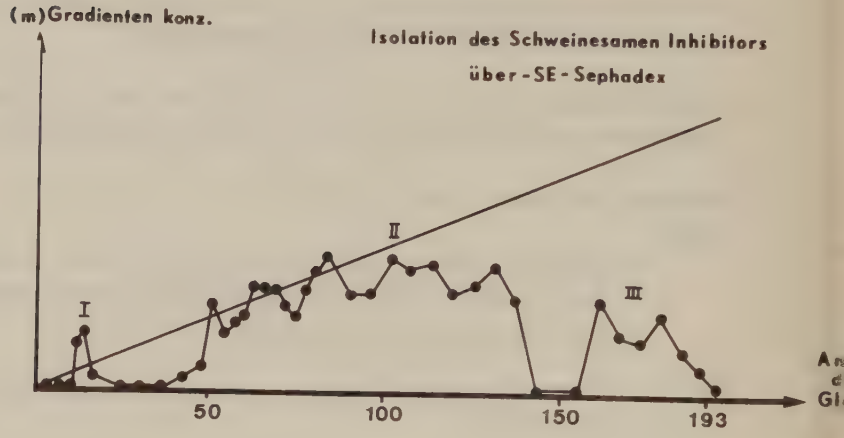
Es gelang eine Trennung in drei Fraktionen:

1. Anteil = ausgefällte Proteine, die eine adsorbierte Inhibitormenge von ca. 3500 ImU i.e. 2 - 3 % mit sich riß.

2. Anteil = ca. 110.000 ImU
Untersuchte Frektion ergab nach zweimaligem Entsalzen über Biogel und Lyophilisieren 28 mg pulverisierte Substanz.

3. Anteil = ca. 19.000 ImU
Nach einmaligem unvollständigen Entsalzen über Biogel ergab

sich ein Verlust von 50 %. Menge war zu gering, als daß sie hätte genau untersucht werden können.



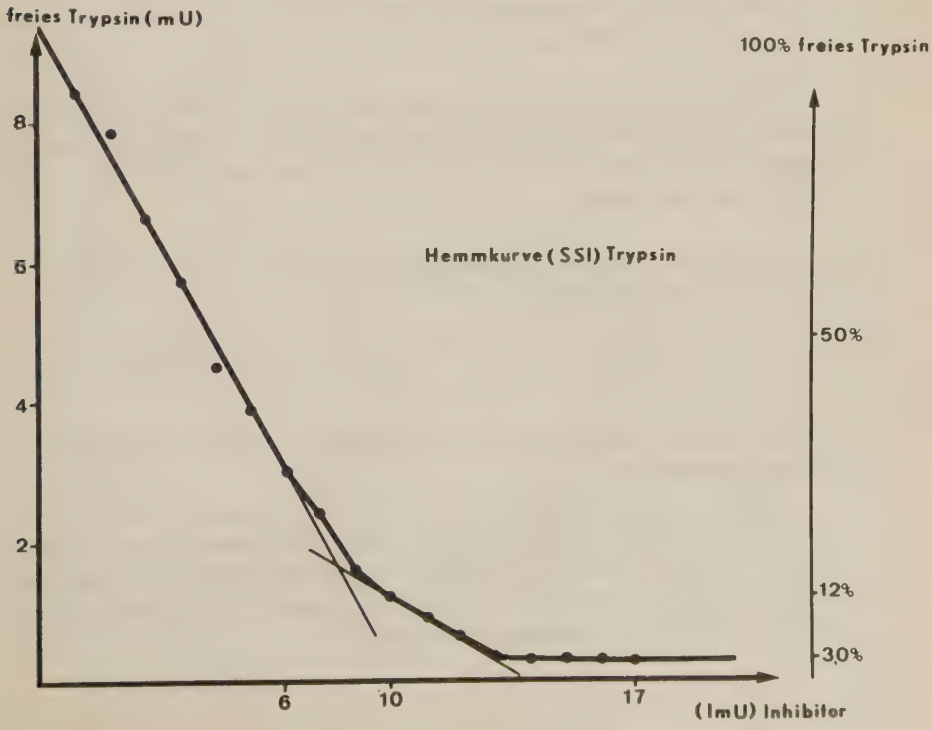
Chemische Eigenschaften des Inhibitors aus Schweinesperma

1. Hemmzeit und spezifische Aktivität:

Eine auffallende Eigenart - sie wurde bereits bei den spezifischen Trypsininhibitoren erwähnt - ist die Enzym-Inhibitor-Komplexbildung nach mehr oder weniger langer Inkubiertung von Inhibitor und dem Enzym Trypsin. Der unmittelbar nach Inkubation abgelesene Wert ändert sich beim SSI (Schweinesameninhibitor) auch nach zunehmender Inkubationszeit nicht mehr. (Temp. 25°C, pH = 7, 8) Es tritt also sofort eine vollständige Hemmung ein.

2. Hemmverhalten gegenüber Trypsin:

Im Gegensatz zu den Inhibitoren aus Pancreas von Schwein und Mensch zeigt die graphische Darstellung keine lineare Hemmung der Trypsinaktivität bis zum 100 %igen Wert. Eine vollständige Hemmung konnte nicht einmal mit einem 170 %igen Überschuß erzielt werden.



Dieses Verhalten spricht für das Vorliegen größerer Dissoziationskonstanten bei den betreffenden Komplexen. Die Hemmkurve zeigt bis zu einem 85 %igen Hemmgrad eine lineare Zunahme der Hemmung bei steigenden Mengen an Inhibitorzusatz. Auch bei hohem Inhibitorüberschuß ist eine vollständige Hemmung nicht zu erzielen.

3. Temporäre Hemmung:

Diese interessante "Hemmung Auf Zeit" wurde das erste Mal von LASOWSKY und WU (18) am Beispiel des von KAZAL (19) isolierten Inhibitors beschrieben. Liegt der Inhibitor im Überschuß gegenüber Trypsin vor, so wird er nur sehr langsam abgebaut. Bei den meisten Inhibitoren war nach 4stündiger Inkubationszeit bei 37 °C noch kein freies Trypsin nachweisbar - obwohl jeweils nur ein geringer Inhibitorüberschuß vorhanden war; zerstört wurden sie nach ca. 24 - 28 Stunden. (20)

Ist das vorgelegte Trypsin jedoch nur z.T. gehemmt (beim SSI zu 83 %), so werden fast alle bekannten Inhibitoren relativ rasch abgebaut; der SSI bereits nach 4 - 5 Stunden, wobei entsprechende Mengen freien Trypsins nachweisbar werden. Die Geschwindigkeit der Zerstörung hängt demnach vom Hemmgrad und der Konzentration der Ausgangspartner ab. (20)

Unter den gleichen Versuchsbedingungen wird z.B. der Inhibitor aus Rinderpancreas viel schneller abgebaut als beispielsweise der Inhibitor aus menschlichem Pancreas. Als Grund zeichnet vielleicht die speciesbedingte Aminosäurezusammensetzung.

Lasowsky und Wu forderten folgenden Mechanismus für die temporäre Hemmung: (T-Trypsin, I-Inhibitor) (21)

$$T + I \longrightarrow \underset{\text{Komplex}}{(TI)} + T \longrightarrow \underset{\text{Komplex}}{(TIT)} \longrightarrow 2\,T + \text{Produkte}$$

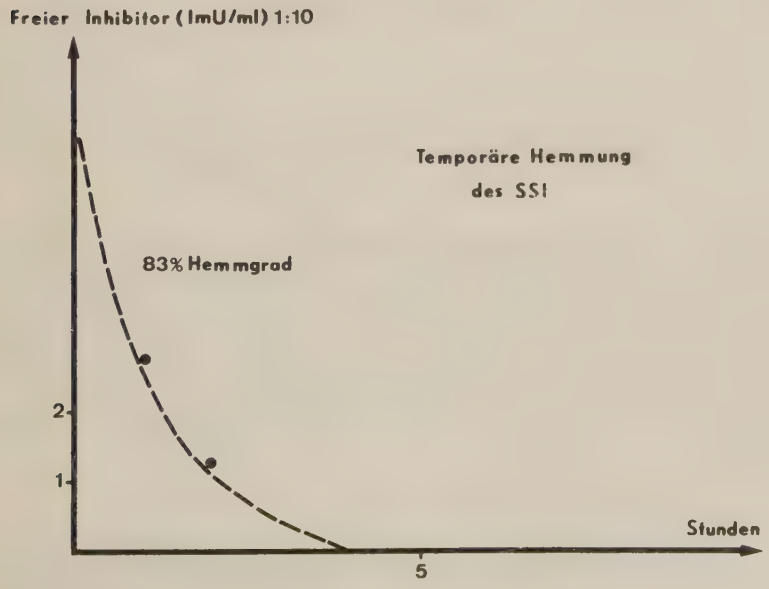
Demnach bildet sich zunächst der (TI)-Komplex, in dem der Inhibitor weitgehend geschützt ist.

Zusammen mit Tscheche wurde nachgewiesen, daß weitere, durch Trypsin spaltbare Arginyl- oder Lysilbindungen im Inhibitormolekül vorhanden sind, die vermutlich eine geringere Affinität zum aktiven Zentrum des Trypsins haben, als das Hemmzentrum des Inhibitors.

Denkbar ist auch eine Veränderung der Tertiärstruktur des Inhibitors im (TI)Komplex der Art, daß die von Trypsin spaltbaren Bindungen erst für das Trypsin zugänglich werden.

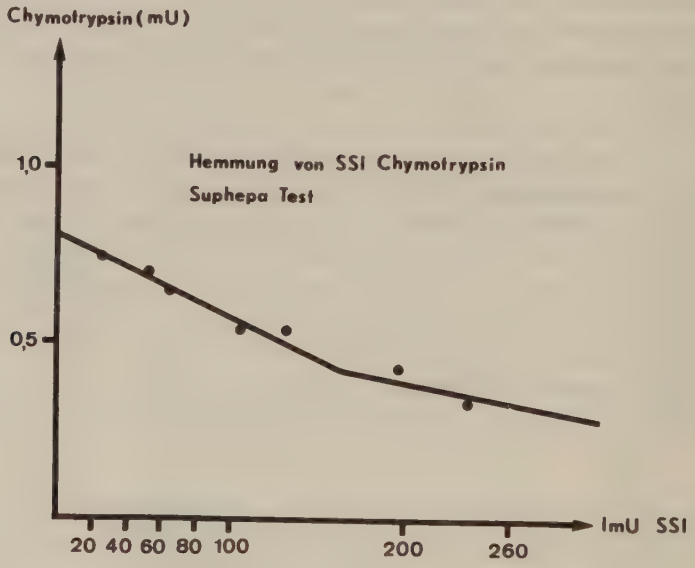
In beiden Fällen führt erst ein über den (TI)Komplex hinaus vorhandener Trypsinüberschuß zur Umwandlung der nativen Fraktion 1 eines Inhibitors in die ebenfalls aktiven Fraktionen 2 und 3; schließlich durch weitere Spaltung zur Bildung von kleinen Peptidstücken, die sich vom Trypsin als inaktive Stücke ablösen.

Für den langsamen Abbau des Inhibitors im (TI)Komplex ist entweder die, wenn auch sehr geringe, Dissoziation dieses Komplexes verantwortlich (auch bei einem Ki-Wert von 10 - 12 ist immer etwas Trypsin frei, das den (TIT) Komplex bilden kann) oder die Arginyl bzw. die Lysil-Bindungen des Hemmzentrums sind ebenfalls, wenn auch extrem langsam, durch Trypsin spaltbar.



4. Hemmverhalten gegenüber Chymotrypsin (23):

Wie die spezifischen Trypsininhibitoren aus Pancreas von Schwein, Hund und anderen Tieren, hemmt der SSI Chymotrypsin nicht.



Jeweils 20 - 26/ ImU (12 - 160 ng) des Inhibitors hatten keinen Einfluß auf die CPPN- und L-Tyrosin-Äthylester spaltende Aktivität von 20 ng (1 ImU) Chymotrypsin im 3 ml Ansatz. Die Hemmkurve läßt bis zu einem Hemmgrad von ca. 40 % eine lineare Pseudohemmung erkennen - ohne jedoch nur annähernd bei weiterem Inhibitorzusatz eine vollständige Hemmung zu erzielen. Die entstandenen Komplexe lassen besonders hohe Dissoziationskonstanten vermuten.

5. Hemmverhalten des SSI gegenüber Plasmin:

Die Plasminaktivität wurde mit Hilfe der Substrate N-Benzoyl-Arginin-p-Nitroanilid gemessen. Der Hemmkurve nach zu urteilen erfolgt eine Hemmung bis zu einem Hemmgrad von 85 % linear. Bei mehr oder minder großem Inhibitorzusatz erfolgt eine vollständige Hemmung.

Der Ansatz für den Test lautet:

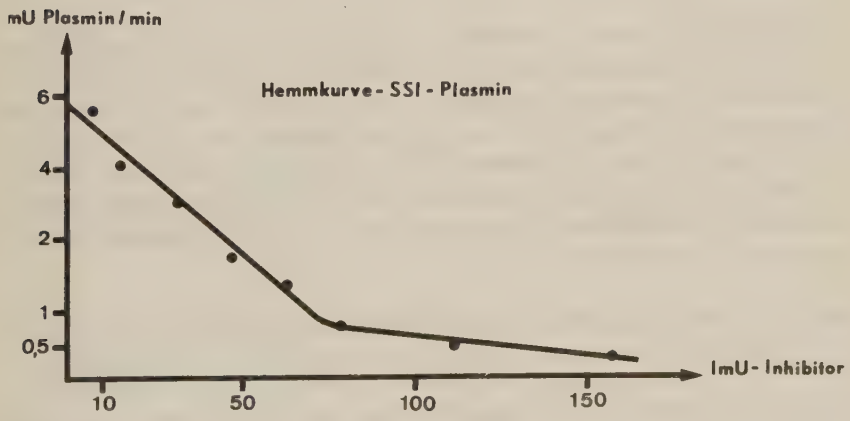
0, 2 ml Plasminlösung (0, 2 Novo-Einheiten, i.e. ca. 170 ng Plasmin oder 1, 7 nMol)

0, 7 ml 0, 05 m Triäthanolaminpuffer
pH-7, 8

o, 1 ml Inhibitorlösung (250 ImU für Trypsin, d.s. 75 ng Inhibitor oder 12, 5 nMol) (24)

Die Mischung wurde 10 min bei 25°C inkubiert, dann wurden o, 1 ml davon zur Bestimmung der Plasminaktivität zum Test eingesetzt.

Bezugswert: 0, 2 ml Plasminlösung + 0, 8 ml Triäthanolaminpuffer inkubiert und getestet wie der Hemmansatz.



6. + 7. Die Enzymaktivitäten von Kallikrein und Thrombin werden nicht gehemmt.

Neben dem vorangegangenen Inhibitor aus Schweinesperma wurden bereits aus den Samenblasen und dem Sperma anderer Tiere ähnliche Inhibitoren isoliert.

Folgende Tabelle zeigt zusammenfassend die Eigenschaften der bisher dargestellten Inhibitoren aus den accessorischen Geschlechtsdrüsen:
(s. Tab. S. 15 a)

Diskussion und Zusammenfassung

Alle aufgeführten Samenblaseninhibitoren zeigen das Phänomen der temporären Hemmung

Wie aus den oben aufgezeigten Eigenschaften ersichtlich, gehören die Inhibitoren aus den accessorischen Geschlechtsdrüsen zu der Gruppe der Trypsininhibitoren, die wie der niedermolekulare Inhibitor aus Bauchspeicheldrüsen oder der hochmolekulare Inhibitor des Blutplasmas allgemein bei den Säugern verbreitet sind; jedoch einschränkend gesehen - nur bei den männlichen Individuen.

Ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal zu den Trypsininhibitoren ist jedoch ihre Hormonabhängigkeit.

Haendle ging bei seinen Versuchen an Mäusen davon aus, daß Funktion und Wachstum der accessorischen Geschlechtsdrüsen von den Hormonen des Hypophysenvorderlappens gesteuert werden. (26) Tatsächlich zeigt sich nach Testosterongaben bei Mäusen eine Steigerung der Synthese des Samenblaseninhibitors auf das 4-fache, bei kastrierten Mäusen sogar auf das 50-fache. Einher mit der Inhibitorkonzentrationszunahme geht anfänglich auch eine Wachstumszunahme der Samenblasen, die später sistiert - die Inhibitorkonzentration steigt jedoch weiter an.

Der Schweinespermainhibitor verhält sich wie die oben genannten Inhibitoren der accessorischen Geschlechtsdrüsen anderer Säuger und des Menschen.

Wie aus den vorangegangenen Betrachtungen hervorgeht, besteht eine genaue Abgrenzung im Hemmspektrum allen anderen Inhibitoren gegenüber, da diese außer Trypsin entweder auch Chymotrypsin oder die Kallikreine hemmen.

Der spezifische Trypsininhibitor aus dem Pancreas anderer Säuger vermag Plasmin nicht zu hemmen. Eine Ausnahme bildet der Inhibitoranteil aus den Samenblasen des Stieres, der das gleiche Hemmverhalten wie der poyvalente Trasyloinhibitor aus Rinderorganen aufweist.

Aufgrund der hohen Konzentrationen, in denen die Inhibitoren in den accessorischen Geschlechtsdrüsen vorkommen (Meerschweinchen: 5 IE, nur von dem Submandibularisinhib. der Katze übertroffen) ist es interessant, auf ihre physiologische Bedeutung einzugehen:

Inhibitor aus	Inhalt ImU/g	Hemmung von Try	Chy	Kall	Plas	Thr	Abbau durch Try	Chy	Pep	Säure Hitze stabil	Elph Frak
Samenblasen											
Meerschw.	5000	+	-	-	+	-	+	+	+	+	2
Maus	2500	+	-	-	+	-	+	+	+	+	2
Rind 1	1000	+	-	-	+	-	+	+	+	+	2
2		+	+	+	+	+	-	-	-	-	
Mensch	50										
Ratte	1600										
Hamster	400										
Sperma											
Bulle	3000	+	-	-	+		+	+	+	+	
Mann	150	+	-	-	+		+		+		2
Eber	1000	+	-	-	+		+	+	+		
Schwein		+	-	-	+	-	+			+	

	MG	Autor
	6800	Fritz Haendle
	6800	Trautschold Werle u. Mitarb.
	6800 6500	
	6800	
		Werle u. Mitarb.

Im natürlichen Befruchtungsablauf der Säugetiere erwarten die Spermien die Ankunft des reifen Eies in der Tube der Weibchen. Diese Wartezeit beträgt bei den einzelnen Species z.B. beim Hasen (27) 6 Stunden, Frettchen 24 Stunden, Schwein Schaaf Rind ca. 20 - 30 Stunden, bei den Fledermäusen sogar mehrere Monate. Untersuchungen haben ergeben, daß diese Zeit für die Reifung der Spermien benötigt wird.

Ein Spermium ist - gemäß seinen beiden Hauptfunktionen - morphologisch in zwei Anteile zu trennen (28):

1., Der Kopfteil: Symbol der Fruchtbarkeit.
DNS-Überträger des genetischen Materials, mit dem "Kopfähnlichen" Überzug-Acrosom (Galea Capitis) genannt und dem Hinterkappenanteil.

2., Das Flagellum: Symbol der Motilität, mit seinem komplizierten Mittel- und Schwanzstück.

Nach Beobachtungen von WILLIAMS und SAVAGE (1925), BLOM (1945), HANCOCK (1952 + 1957) u.a. fanden AUSTIN und CHANG (1951) unabhängig voneinander, daß bei der Reifung der Spermien, der sogenannten "Kapazitation", Acrosom oder Kopfkappe zugrunde gehen, und so die in ihnen vermuteten lytischen Enzyme freiwerden, um dem Spermium den Weg durch die Eihüllen (Corona Radiata und meist die Matri des Cumulus Oopherus) zu bahnen. (29)

BEDFORD (30) zeigte anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen, daß sich das "eiferne (unreife)" von dem "einahen (reifen)" Spermium eben durch das Fehlen dieser Kopfkappe unterscheiden. Das gleiche Phänomen bestätigte 1967 ERICSON (27, 31), daß ein Tetracyclin-Fluoreszenz-Schleier, der auf den Kopf von Spermien (Mensch und Rhesusaffe) fixiert wurde, nach 12-stündiger Inkubation in den Uteri von Mäusen, Ratten, Hamstern und Hasen aufgelöst wurde.

Der Vorgang der Kapazitation ist hormonabhängig, wie Changs Experimente mit Hasen zeigen: in hypophysektomierten Hasen, bei denen eine Kapazitation sonst ausbleibt, gelang ihm diese durch Gaben von 200 - 200 ng Luteinisierungshormon. Er stellte weiterhin eine Steigerung der Kapazitation fest, als er mit Oestrogenen gespritzte Hasen mit 75 ng HCC (Human Chorion Gonadotropin) behandelte.

Oestrogene fördern also die Kapazitation in Tube und Uterus und verlängern in höherer Konzentration die Lebensdauer des reifen Eies. Gestagene (Progesteron) und somit erzeugte Pseudoschwangerschaften verhindern die Kapazitation. Der genaue Angriffspunkt der Hormone ist noch nicht geklärt.

1957 wies nun CHANG eine Substanz im Samenplasma von Hasen, Bullen und Menschen nach, die die Kapazitation der Spermien nach kurzer Inkubation mit dem Samenplasma aufhob; er nannte sie den Dekapazitationsfaktor (33).

Gemeinsam mit Bedford gelang es Chang durch Ultrazentrifugation und anderen Reinigungsmethoden diesen Faktor darzustellen:
Sein MG beträgt ca 300 - 500, der Proteinaseverdauungversuch läßt darauf schließen, daß es sich nicht um ein Protein handelt; ebenso ergab sich nach Jodination kein Aktivitätsverlust. Der Dekapazitationsfaktor zeigt ein Absorptionsmaximum im UV-Licht 233 mn; er wird bei einem pH-Wert von 10 bei 37 °C in 20 min zerstört.

BEDFORD zeigte (34), das einmal kapazitierte Spermien eine wesentlich geringere Zeit zum Überleben haben als wieder dekapazierte. So erhielt Bedford z.B. bei Hasen eine Fertilitätsverlängerung der dekapazitierten Spermien um mehr als das Doppelte. Nur so ist es vielleicht zu verstehen, daß Spermien von Fledermäusen und einiger Schlangenarten oder der Winterschläfer eine Fertilität von mehreren Monaten, Jahren haben.

Aussagen über den genauen Mechanismus bei der Kapazitation und Dekapazitation sind nicht zu machen. Bedford nimmt z.B. an, daß die Kapazitation in zwei Schritten vor sich geht (35): in einem unspezifischen, der sich auch in der Umgebung eines artfremden Uterus vollziehen läßt und in einen spezifischen.

Der Dekapazitationsfaktor wird aus dem Uterusmilieu aufgenommen und soll verhindern, daß, gerade bei den spontan ovulierenden Tierarten, eine sofortige Verschmelzung noch nicht reifer Gameten vor sich geht. Nur die Spermien, die sich über mehrere Stunden im Uterus und in der Tube am Leben gehalten haben, sind wahrhaft befruchtungsfähig.

HAENDLE und INGRISCH (36) gelang in noch laufenden Versuchen der Nachweis, daß der Inhibitor aus den menschlichen Samenblasen die lytischen Enzyme, die bei der Acrosomenreaktion frei werden, zu blockieren vermag: unterm Mikros-

kop erfolgte also keine Auflösung der Eihüllen.

Weitere noch zu untermauernde Versuche ergaben, daß der Befruchtungserfolg bei Kaninchen unterbleibt, wenn neben kapazitierten Spermien noch Inhibitor aus Samenblasen in eine Tube appliziert wurde. Der Kontrollversuch in der anderen Tube - ohne Inhibitor - führte zu einer Schwangerschaft. Es zeigte sich weiterhin, daß die reifen Eier länger in der Tube persistieren, ehe sie aufgelöst werden.

Eine Deutung Dekapazitationsfaktor und Samenblaseninhibitor seien identisch, kann momentan noch nicht genügend basiert werden; Daher seien nur einige Meinungen über ihre Funktionen aufgezeigt:

Soupart und Haendle: Jedes kapazitierte Spermium ist befähigt, in alle lebenden Zellen einzudringen, also auch in die Vaginal- und Uterusschleimhaut, die Tubenschleimhäute u.a.. Ihr Bestimmungsort ist jedoch die Eizelle. Damit dieses Ziel erreicht wird, könnte dem Dekapazitationsfaktor eine richtungsgebende Funktion obliegen, indem ein Eindringen mit pathologischen Folgen verhindert wird.

Der Dekapazitationsfaktor und der Samenblaseninhibitor haben laut o.a. Versuchsergebnissen die Möglichkeit, die Lebensdauer des Eies zu verlängern, um den Spermien die zur Reifung erforderliche Zeit zu bieten. Ebenso verlängern sie - laut Bedford - die Lebensdauer der Spermien. Beide kommen nur in einem physiologisch gut eingestellten Uterus und Vaginalmilieu vor.

Alle oben aufgeführten Betrachtungen drängen einem förmlich den Gedanken auf, neue Wege der Geburtenregelung zu finden. Zwei biochemische Vorgänge bieten sich dafür besonders an:

1. Das Phänomen der Kapazitation, eine Möglichkeit gezielt in den Vorgang der Befruchtung einzugreifen und als
2. die Tatsache, daß bei pathologisch verändertem Uterus- und Tubenmilieu ein artfremder Uterus als "Amme" für das Heranreifen der Spermien herangezogen werden kann.

Literaturverzeichnis

1. P. Starlinger (Angew.Chemie 75, 71, 1963)
N.H.Horowitz u.R.L.Metzenberg (Annual Rev.Biochemie, 34, 235, 1965)

2. J.P.Changeux (Scietific American 212, 36, 1965)
F.Jakob (Journal of molec.Biolog. 6, 306, 1963)

3. Rackis 1964, Mc.Donnel et al.1954, Bundy et al.1958

4. M.Kunitz und J.H.Nortrop, Journ.gen.Physiologie 19, 991, 1936

5. H.Kraut et E.K.Frey und E.Werle, Z.physio.Chemie 192, 1, 1930
Dieselben Autoren u.F.Schulz, Z.physiol.Chemie 230, 259, 1934

6. L.A.Kazal, D.S.Spicer u.R.H.Brahinsky, J.Americ.Chem.,Soc., 70, 3034, 1934

7. M.H.Kalser u.Mitarb.u.M.I.Grossmann: Gastroenterology 26, 189, 1954 u.29, 35, 1955. M.J.Grossmann: Fed.Proc.17, 62, 1958 u.Proc.Soc.exp. Biol.Med.99, 304, 1958. W.Katz, M.Silverstein, E.E.Kobold u.A.P. Thal, Surgery-89, 322, 1964. P.H.Negulesku, A.Harper, J.T.Grane, L.Goldmann: Americ.J.Surg.-102, 196, 1961, B.J.Haverback, B.Dyce, H.Bundy u.H.A.Edmundson: Amerc.J.Med.29, 424, 1960

8. H.Fritz, Habilitationsschrift, 50-54

9. H.Tschesche: Z.physiol.Chemie-348, 1216, 1967, H.Fritz, Hochstrasser u.I.Hüller

10. Fritz: Habilarbeit-57, 58

11. H.Tscheche: Z.physiol.Chem.348, 1216, 1967 u.wie 9

12. H.Fritz: Habilarb.73, M.M.Forell, H.Stahlheber, P.Lehnert, M.Hutzel, H.Fritz u.E.Werle unveröffentlicht

13. H.Fritz, E.Werle, Habilarb.77

14. L.Greene, D.S.Fackre, M.Rigbi: Federal Proc.25, 3405, 1966
L.J.Greene: J.Biolog.Chemie-24, 5610, 1966. P.J.Keller, B.J.Allan, J.Biolog.Chemie 242, 281, 1967. B.J.Haverbeck, B.Dyce, H.Bundy, H.A.Edmunson: Americ.J.M. 29, 424, 1960

15. H.Haendle, Z.Ziegler, E.Werle in Vorb.H.Fritz, Trautschold, H.Haendle E.Werle: Z.physiol.Chemie-343, 185, 1965

16. I. Trautschold, Habilarbeit-1965, H. Fritz, E. Werle: Hypertensive Peptides, 221 Springerverlag, New York 1966

17. 16 + R. Vogel, I. Trautschold u. E. Werle: Natürl. Proteinaseninhib. Georg Thieme Verlag, 1966, G. Zickgraf-Hüdel: Biochem. Phamacolog. 16, 59, 1967 u. Arzneimittelforschg. 16, 15o7, 1966. R. Marx: Münchner Med. Wochenz. 108, 1267, 1967. R. Gross u. G. Kronenberg: Neue Aspekte der Trasylotherapie-F. K. Schattauer Verlag 1966. I. Trautschold, H. Fritz, E. Werle, Eckert in "Hypertensive Peptides" E. G. Erdös, N. Back u. F. Sicituri, Springer-Verlag, New York 1966

18. M. Laskowsky u. F. C. Wu: J. Biolog. Chemie 204, 797, 1953

19. J. Americ. Chem. Soc. 70, 3034, 1948

20. H. Fritz, G. Hartwich, E. Werle: Z. physiolog. Chemie 345, 150, 1966

21. H. Fritz, F. Woitinas, E. Werle: Z. phys. Chemie 345, 168, 1966

22. M. Laskowsky u. Wu: J. Biolog. Chem. 204, 797, 1953

23. Kurve angefertigt von Frl. Meister

24. Dr. Fritz-Habilarb. 67 Kurve Frl. Meister

25. Frl. Meister

26. Hoppe-Seyler: Phys. Chemie 343, 185, 1965. H. Haendle, H. Fritz, I. Trautschold, E. Werle

27. W. R. Dukelow u. H. N. Chernoff: Americ. J. of Phys. Vol 215, No 3 March 1966 683

28. Biochemestry of Semen, Mann Chapter 2

29. Austin, C. R.: Austral. J Sci. Res. B 4, 581 1951 + 28-Chang M. C. Nature 168, 697, 1951

30. Barros, Bedford, Franklin, Austin: J. Cell. Biolog. 1967

31. ---- 27

32. M. C. Chang: Hormonal Regulation of sperm Capacitation. Shrensbury-Mass. USA

33. Summary: Decapacitationfactor and Capacitation, Williams, Department of Biochem. Univ. of Georgia, Athens, Georgia 30601

34. 27.J.Reprod.Fertility 13, 361, 364, 1967. Bedford, 685

35. J.M.Fertile live of rabbit spermatozoa in rat uterus, Nature, 213, 1o97-99 1967

36. Noch laufende Versuche, unveröffentlicht. Haendle u.Ingrisch

Lebenslauf

14.6.1944	geboren als Sohn des Arztes Dr.med.Eckehard Frühbrodt und seiner Ehefrau Edith, geb.Schreiber in Namslau/Schlesien
1952	Einschulung in die Volksschule am Buntentorsteinweg in Bremen
1956	Einschulung in das Gymnasium an der Hermann-Böse-Straße
1962	Einschulung in das Staatl. Nordsee-Gymnasium von Bad St.Peter-Ording
1965	Abitur und Beginn mit dem Studium der Chemie an der Universität Hamburg
1965	Aufnahme des Medizinstudiums an der Universität München
1971	16. Juni 1971 Medizinisches Staatsexamen in München
Juni 1968	Beginn der vorliegenden experimentellen Doktorarbeit im Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Universität München